

198. Theodor Wieland*) und Helmut Fritz**): Stufenweiser Abbau von Peptiden mit Hilfe der Lossenschen Reaktion

[Aus dem Organisch-chemischen Institut der Universität Mainz]

(Eingegangen am 22. Juni 1953)

N-acylierte Oligopeptide lassen sich mit Hilfe der Lossenschen Reaktion (Wasser-Abspaltung aus Hydroxamsäuren) vom Carboxyl-Ende her abbauen. Die dabei abgespaltene endständige Aminosäure läßt sich in Form des um ein C-Atom ärmeren Aldehyds als dessen Dinitrophenylhydrazon nachweisen. Das andere Spaltstück, ein Amid des verkürzten Peptids, wird alkalisch zur Säure verseift, von der aus der Abbau stufenweise weitergeführt werden kann. Die Bereitung der als Ausgangsstoffe dienenden Hydroxamsäuren sowie einiger freier Aminohydroxamsäuren und ihr Verhalten bei der Hydrolyse gegenüber Cu^{II} und bei der thermischen Zersetzung wird beschrieben.

Systematische Abbaureaktionen an Peptiden, durch welche die Bausteinreihenfolge dieser Naturstoffe aufgeklärt werden kann, sind besonders in den letzten Jahren an zahlreichen Stellen eingehend untersucht worden. Während man zum Zweck des Abbaus vom Aminogruppen-Ende her mehrere Reaktionsfolgen mit gutem Erfolg anzuwenden gelernt hat (Phenylisocyanat-Methode von Bergmann und Mitarbb.¹⁾, Phenylisothiocyanat-Methode von P. Edman²⁾, Schwefelkohlenstoff-Methode von J. Léonis und L. Levy³⁾, *o*-Amino-*N*-phenyl-Derivat-Verfahren von Holley⁴⁾, Methylxanthogensäure-ester-Methode von G. W. Kenner und H. G. Khorana⁵⁾, Carbäthoxy-Verfahren von Wessely u. Mitarbb.⁶⁾ u. a.), läßt sowohl Auswahl als auch Leistungsfähigkeit der uns zu Gebote stehenden Abbauewege vom Carboxyl-Ende der Kette her noch manchen Wunsch offen. Die von P. Schlack und W. Kumpf⁷⁾ aufgefundene Reaktion, die in der Umsetzung der Carboxygruppe mit rhodanwasserstoffsäuren Salzen i. Ggw. von Essigsäureanhydrid zu einem *N*-Acyl-thiohydantoin besteht, dessen labil gebundener Acylrest durch schwaches Alkali abgespalten wird, ist später in einzelnen Stufen verbessert worden (S. G. Waley u. J. Watson⁸⁾; D. W. Kenner, H. G. Khorana und R. J. Stedman⁹⁾). Weitere interessante Abbaureaktionen (H. G. Khorana¹⁰⁾, K. Bailey¹¹⁾) seien hier nur zitiert; auf die kürzlich von R. A. Boissonnas¹²⁾ veröffentlichte wird später kurz eingegangen. Früher hatten M. Bergmann und L. Zervas¹³⁾ eine andersartige kompliziertere Möglichkeit für denselben Zweck angegeben, die hier kurz geschildert sei, da unser neues Verfahren eine gewisse Ähnlichkeit mit ihr besitzt. Nach Bergmann wird das am Amino-Ende acylierte Peptid über den Ester und das Hydrazid in das Azid übergeführt. Dieses

*) Herrn Prof. E. Weitz in Verehrung zum 70. Geburtstag gewidmet.

**) Dissertat. H. Fritz, Mainz 1953.

1) M. Bergmann, A. Miekeley u. E. Kann, Liebigs Ann. Chem. **458**, 56 [1927].

2) Acta chem. scand. **4**, 283 [1950].

3) Bull. Soc. Chim. biol. **33**, 779 [1951].

4) R. W. Holley u. A. D. Holley, J. Amer. chem. Soc. **74**, 5445 [1952].

5) J. chem. Soc. [London] **1952**, 2076.

6) F. Wessely, K. Schlögel u. G. Korger, Nature [London] **169**, 708 [1952].

7) Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **154**, 125 [1926].

8) J. chem. Soc. [London] **1951**, 2394.

9) J. chem. Soc. [London] **1953**, 673.

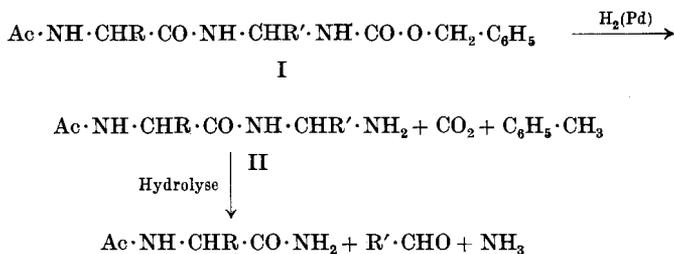
10) J. chem. Soc. [London] **1952**, 2081.

11) 11^e Congrès International de Biochimie, Paris 21.–27. Juillet 1952.

12) Helv. chim. Acta **35**, 2226 [1952].

13) Ber. dtsh. chem. Ges. **65**, 1192 [1932].

setzt man nun in benzylalkoholischer Lösung zum Urethan (I) um (Curtiusche Reaktion) und hydriert dieses katalytisch zu einem sehr leicht spaltbaren Aldehydammoniak-Derivat (II), das in saurer Lösung zum Aldehyd, Ammoniak und dem Amid der verkürzten Peptidkette aufgespalten wird:



Unser Studium über einzelne Aminohydroxamsäuren¹⁴⁾ hat uns dazu geführt, die altbekannte Lossensche Abbaureaktion¹⁵⁾ der Hydroxamsäuren zum Peptidabbau heranzuziehen. Vorher haben wir die Körperklasse der Aminohydroxamsäuren an einigen Verbindungen etwas näher untersucht, worüber zuerst berichtet werden soll.

Aminohydroxamsäuren

Von diesen Aminosäure-Derivaten war bis vor wenigen Jahren nur eine Verbindung, die Glycinhydroxamsäure¹⁶⁾, bekannt. Wie jene, so lassen sich auch die anderen Aminohydroxamsäuren aus den Estern mit alkoholischer Hydroxylamin-Lösung leicht erhalten. Auf diesem Weg hat man die Hydroxamsäuren des *d,l*-Alanins¹⁷⁾, *d,l*-Valins¹⁷⁾ und *d,l*-Isoleucins¹⁷⁾ sowie der α -Amino-buttersäure¹⁸⁾ und Glutaminoyl- γ -monohydroxamsäure¹⁹⁾ dargestellt. Wir haben außer diesen noch die Hydroxamsäuren des *d,l*-Leucins und die Glutaminoyl- α -monohydroxamsäure (III) synthetisiert. Diese entstand, als man Glutaminsäure-dimethylester in nicht ganz wasserfreier alkoholischer Lösung mit Hydroxylamin zur Reaktion brachte. Daneben hatte sich auch die Pyrrolidon- α -carboxyl-hydroxamsäure gebildet, die aus Pyrrolidon- α -carbonsäureester mit Hydroxylamin einheitlich erhältlich ist.

Die neue Glutaminoyl- α -monohydroxamsäure wurde im Papierchromatogramm mit einer Probe der γ -Säure verglichen, die wir durch Umsetzung von Glutamin und Glutaminsäure- γ -äthylester mit Hydroxylamin zum Vergleich bereiteten. Sie zeigte ein deutlich verschiedenes Verhalten. R_F -Wert: 0.11 für die α -Säure, 0.06 für die γ -Verbindung, in *sek.*-Butanol + Ameisensäure + Wasser (75:15:10).

Alle Aminohydroxamsäuren geben mit Eisen(III)-chlorid eine intensive weinrote Färbung, die jedoch im Gegensatz zu den gewöhnlichen Verbindungen dieses Typs nur gegen schwache Säure beständig ist. Sie verschwindet bei Zugabe von verdünnter Salzsäure vollständig und kehrt beim

¹⁴⁾ Th. Wieland u. W. Schäfer, Liebigs Ann. Chem. **576**, 107 [1952].

¹⁵⁾ W. Lossen, Liebigs Ann. Chem. **175**, 313 [1875].

¹⁶⁾ H. Ley u. F. Männchen, Ber. dtsh. chem. Ges. **46**, 751 [1913].

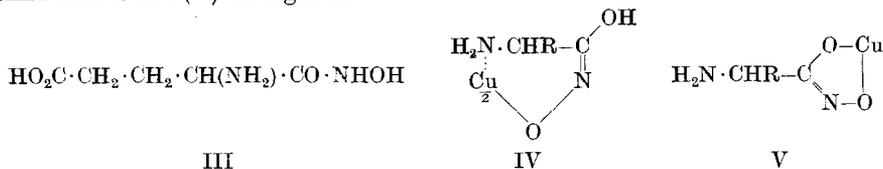
¹⁷⁾ K. G. Cunningham, G. T. Newbold, F. S. Spring u. J. Stark, J. chem. Soc. [London] **1949**, 2091. ¹⁸⁾ G. Dunn u. Mitarbb., J. chem. Soc. [London] **1949**, 2707.

¹⁹⁾ J. A. Roper u. H. McIlwain, Biochem. J. **42**, 435 [1948].

Abstumpfen wieder zurück. Mit der Eisen(III)-chlorid-Reaktion können die Aminohydroxamsäuren in Lösung noch in einer Konzentration von $10^{-3}\%$, auf dem Papierchromatogramm in 0.1-proz. Lösung nachgewiesen werden. Mit Ninhydrin geben sie in wäßriger Lösung beim Kochen eine gelbrote bis rote Färbung, im Papierchromatogramm beim Erwärmen gelbbraune Flecken. Dieser Nachweis ist etwas weniger empfindlich als der oben genannte. In Bestätigung des Unterschieds der beiden Glutaminoyl-monohydroxamsäuren gibt nur die α -Verbindung diesen, dagegen die γ -Säure einen für Aminosäuren charakteristischen blauvioletten Farbton. Weitere, weniger empfindliche Nachweismöglichkeiten beruhen auf der reduzierenden Wirkung gegen ammoniakalische Ag^{\oplus} -Lösung oder eine alkalische Lösung von Triphenyltetrazoliumchlorid in der Wärme.

Die Aminohydroxamsäuren sind weiße, feinkristalline Verbindungen, deren wäßrige Lösungen ziemlich stark basisch reagieren. Bei der Papierelektrophorese wandern sie bei neutralem p_{H} deutlich zur Kathode. Ihre Löslichkeit in Wasser ist bedeutend geringer als die der zugrunde liegenden Aminosäuren und nimmt wie dort mit steigender Länge der Alkylkette ab.

Wie α -Aminosäuren, so geben auch die α -Aminohydroxamsäuren mit $\text{Cu}^{2\oplus}$ -Ionen innerkomplexe Salze von erheblicher Wasserlöslichkeit. Eine Ausfällung derjenigen von Alanin, Valin, α -Amino-buttersäure, Leucin und Isoleucin aus wäßriger Lösung ist also mit diesem Reagens nicht möglich. Wie bei der von H. Ley und F. Männchen¹⁶⁾ untersuchten Glycinhydroxamsäure bilden sich mit einer verdünnten Cu^{II} -Lösung zunächst die violettfarbenen, sauren dimeren Komplexe (IV), die mit weiterem Cu^{II} in die dunkelgrünen einfachen Salze (V) übergehen.



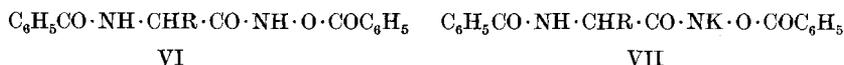
Glutaminoyl- α -monohydroxamsäure läßt sich aus wäßriger Lösung mit Cu^{II} als grasgrüner flockiger Niederschlag ausfällen.

Erhitzt man die aliphatischen Aminohydroxamsäuren über ihren Zersetzungspunkt, so tritt starke Gas-Entwicklung ein, wobei Ammoniak und Kohlendioxyd entweichen. Im Papierchromatogramm zeigt sich danach sehr deutlich der Fleck der zugrunde liegenden Aminosäure.

Diese stellt aber nur ein Nebenprodukt der recht verzweigt verlaufenden Zersetzungsreaktion dar, bei der sich wohl zunächst unter Wasser-Abspaltung das Aminoisocyanat, $\text{H}_2\text{N}\cdot\text{CHR}\cdot\text{NCO}$, bildet, welches infolge seiner großen Reaktionsfreudigkeit zu mehreren Reaktionen fähig ist. So kann es z. B. durch das freie Wasser zu Aldehydammoniak verseift werden, der thermisch unter Iminbildung Ammoniak verliert. Die Papierchromatogramme der Zersetzungsrückstände zeigen die Flecken mehrerer Hydroxamsäuren, die wohl durch Addition einer oder mehrerer Aminoisocyanat-Molekeln an die Aminogruppe der ursprünglichen Aminohydroxamsäure entstanden sind. Das bei der Zersetzung entstehende Wasser ist auch für das Auftreten von freier Aminosäure verantwortlich, die aus der Hydroxamsäure durch Hydrolyse entsteht. Die Aminohydroxamsäuren

sind nämlich, wie wir feststellen konnten, gegen hydrolysierende Agenzien nicht sehr beständig. Mit 20% Pyridin enthaltendem Wasser erfolgt bei 100° bereits in einigen Stunden fast völlige Hydrolyse, die natürlich mit Säuren oder Alkalien in kürzerer Zeit herbeigeführt werden kann.

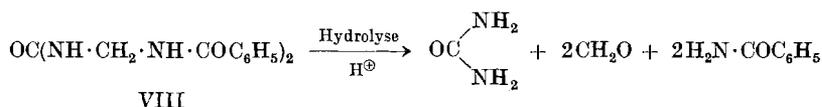
Die Schotten-Baumannsche Reaktion bei Aminohydroxamsäuren liefert als einzig isolierbares Produkt jeweils eine Diacyl-Verbindung, bei der die Acylreste an den Aminostickstoff und die OH-Gruppe des Hydroxylamin-teils getreten sind. Auf diese Weise wurden Alanin und Leucinhydroxamsäure zu den Dibenzoyl-Verbindungen VI umgesetzt.



Die entsprechende Verbindung der Glycinhydroxamsäure (VI; R= H) wurde aus Hippurhydroxamsäure und Benzoylchlorid dargestellt. Nach kurzem Erwärmen mit 1*n*NaOH wird daraus zuerst der *O*-gebundene Acylrest, nach einigen Stunden auch der bedeutend schwerer verseifbare *N*-Acylrest abgespalten. Verbindungen des Typs VI geben mit einem Äquivalent Alkalialkoholat die in Alkohol schwer löslichen, gut kristallisierten *N*-Alkali-Verbindungen VII, die für die nun zu schildernde Abbaureaktion von Bedeutung sind.

Lossenscher Abbau

Die günstigste Ausführungsform des Lossenschen Abbaus²⁰⁾, bei dem formal aus 1 Mol. Hydroxamsäure 1 H₂O abgespalten wird und das intermediär auch beim Hofmann- oder Curtius-Abbau auftretende umlagerungsbereite Gebilde mit Elektronensextett am N-Atom entsteht, ist die, daß man eine *O*-Acylhydroxamsäure (Acetyl-, besser Benzoyl-Verbindung, vergl. VI) in das Natrium- oder Kalium-Salz überführt und dieses in wäßriger Lösung kurze Zeit erhitzt. Dabei findet keine hydrolytische Abspaltung des Acylrestes statt, sondern dieser tritt mit beiden Bindungselektronen zusammen mit dem Metallkation aus. Nach Umlagerung der Rumpfmolekel zum Isocyanat reagiert dieses in bekannter Weise zum symmetrischen Harnstoff, der in unserem Fall, zunächst am Beispiel der Hippursäure untersucht, die Formel VIII hat:



Hierin liegt eine ähnlich verkappte Formaldehyd-Gruppierung wie im Urotropin vor, die bei kurzer Hydrolyse mit Mineralsäuren den Aldehyd freigibt, der in Gegenwart von 2,4-Dinitro-phenylhydrazin als schwer lösliches Hydrazone ausfällt. Außerdem entstehen Harnstoff und Benzamid.

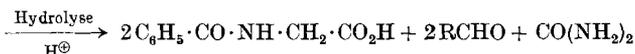
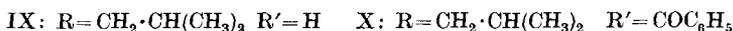
Wir sind nun sofort dazu übergegangen, ein Dipeptid (Glycyl-*d,l*-leucin) nach diesem Verfahren abzubauen. Die hierzu nötige *N*-Benzoylglycyl-*d,l*-leucinhydroxamsäure wurde auf zwei Wegen erhalten:

²⁰⁾ H. Rotermund, Liebigs Ann. Chem. **175**, 257 [1875].

1.) Das *N*-Benzoyl-dipeptid wurde über den Ester mit alkoholischer Hydroxylamin-Lösung umgesetzt.

2.) Unter Umgehung der Esterstufe führte die Anwendung der Anhydrid-Methode²¹⁾ in einem Arbeitsgang zur Hydroxamsäure in einer Ausbeute von etwa 80 %.

In beiden Fällen konnten wir die Schwerlöslichkeit des Cu^{II}-Salzes in Wasser erfolgreich zur Isolierung der *N*-Benzoyl-dipeptidhydroxamsäure IX ausnützen. Mit 65 % Ausbeute konnte die Hydroxamsäure nach der Schotten-Baumannschen Reaktion in die *O*-Benzoyl-Verbindung (X) übergeführt werden, die dann mit der berechneten Menge $n/_{10}$ NaOH in Lösung gebracht wurde. Schon bei Zimmertemperatur begann sich die klare Lösung nach einigen Minuten zu trüben, und nach mehreren Stunden hatte sich das Harnstoff-Derivat XI fast quantitativ als voluminöser Niederschlag ausgeschieden.



Die vollständige hydrolytische Abspaltung des Aldehyds von diesem Isovaleraldehyd-Abkömmling XI gelang uns schon beim kurzen Aufkochen mit wäßriger 2*n* HCl, wobei in Gegenwart von Dinitrophenylhydrazin das analysenreine Dinitrophenylhydrazone des Isovaleraldehyds zur Abscheidung kam. Sein empfindlicher papierchromatographischer Nachweis stellt eine neue Bestimmung der Carboxyl-Endgruppe eines Peptids dar.



Um die Brauchbarkeit der Abbaureaktion an einem Tripeptid zu er härten, wurde nun Glycyl-*d,l*-isoleucyl-*d,l*-alanin derselben Reaktionsfolge unterworfen. Nach der einleitenden Benzoylierung konnte auch hier die Hydroxamsäure XII nach der Anhydridmethode (s.o.) bereitet werden. Als störend wurde dabei allerdings die Schwerlöslichkeit des Triäthylammoniumsalzes in Tetrahydrofuran empfunden, so daß die Ausbeute des ebenfalls über das Cu^{II}-Salz isolierten Zwischenprodukts nur 65 % betrug. Deshalb haben wir hier auf die Bereitung von Hydroxamsäuren aus den Estern zurückgegriffen und mit sehr gutem Erfolg das *N*-Benzoyl-tripeptid mit Diazomethan in den Methylester verwandelt, der dann mit Hydroxylamin in Alkohol die gewünschte Hydroxamsäure in 90-proz. Ausbeute ergab. Diese konnten wir

²¹⁾ Th. Wieland u. H. Bernhard, Liebigs Ann. Chem. 572, 190 [1951].

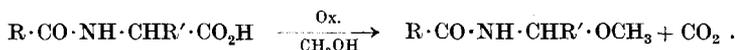
in üblicher Weise mit Benzoylchlorid zur *O*-Benzoyl-Verbindung XIII umsetzen, die sich dann mit der berechneten Menge $n/_{10}$ NaOH in Wasser in erwarteter Weise beim längeren Stehen in den komplizierten, äußerst schwer löslichen *N,N'*-Bis-[α -(benzoyl-glycyl-*d,l*-isoleucyl-amino)-äthyl]-harnstoff (XIV) vom Schmp. gegen 190° (Zers.) verwandelte. Die Verbindung ist von 1 Mol. Kristallwasser auch mit drastischen Mitteln nicht zu befreien. Die carboxyl-



endständige Aminosäure des verwendeten Tripeptids (Alanin) gab sich bei der Hydrolyse des Harnstoff-Derivats XIV mit $n/_{10}$ HCl bei 100° in 5–10 Min. als Acetaldehyd zu erkennen. Im Reaktionsgefäß schied sich nach kurzer Zeit ein weißer, kristalliner Stoff ab, der sowohl in Basen als auch in verd. Säuren unlöslich war und sich als Amid des *N*-Benzoyl-glycyl-*d,l*-isoleucins – also des um einen Baustein verkürzten Peptides – erwies und ebenfalls 1 Mol. Kristallwasser hartnäckig festhält.

Will man von dieser Stufe aus den geschilderten systematischen Abbau weitertreiben, so muß das Amid neuerlich in eine Hydroxamsäure übergeführt werden.

Das Problem einer schonenden Amidverseifung ergibt sich auch bei dem jüngst von R. Boissonnas¹²⁾ beschriebenen Peptid-Abbau, bei dem, wie von R. E. Linstead u. Mitarbb.²²⁾ an *N*-Acyl-aminosäuren gefunden, aus *N*-Acyl-peptiden durch anodische Oxydation in alkoholischer Lösung unter Kohlendioxyd-Abspaltung Acylaminoäther in guter Ausbeute entstehen:



Durch Erhitzen solcher verkappten Aldehyd-Verbindungen während 15 Min. mit 20-proz. Salzsäure auf 100° gelingt es anscheinend in manchen Fällen, mit der Freisetzung des Aldehyds auch eine Verseifung des Amids zu bewerkstelligen, ohne Peptidbindungen anzugreifen. Dieses auch von uns versuchte Vorgehen hat sich nicht ohne gleichzeitigen Angriff auf gewisse Peptidbindungen ausüben lassen, so daß wir uns nach anderen Methoden zu einer partiellen Amidverseifung umgesehen haben.

Für unseren speziellen Fall war natürlich vor allem ein direkter Ersatz der Amid- durch die -NHOH-Gruppierung wünschenswert; es wurde deshalb zunächst nach bekanntem Vorbild versucht, das Amid in alkoholischer Hydroxylamin-Lösung zur Hydroxamsäure umzusetzen. Dazu ließen wir eine solche Lösung mit 3fachem Hydroxylamin-Überschuß in Gegenwart von einem Mol. Natriummethylat bei 40° 12 Stdn. stehen und isolierten die gebildete Hydroxamsäure als Cu^{II} -Salz. Nach dessen Zerlegung erwies das Papierchromatogramm, daß ein Gemisch von 5 Hydroxamsäuren vorlag, die durch Vergleich mit authentischen Proben identifiziert werden konnten. Danach hat im untersuchten *N*-Benzoyl-dipeptidamid XV Spaltung der Amidbindungen, wenn auch nicht mit gleicher Geschwindigkeit, so doch an allen nur möglichen Stellen, stattgefunden.

²²⁾ J. chem. Soc. [London] 1951, 2854.

tere Fraktionen der Hydroxamsäure. Zur Analyse wurde aus Wasser umkristallisiert. Kein charakterer Zersetzungspunkt, sintert von 175 bis 196°; R_F-Wert: 0.33²⁵).

C₆H₁₄O₂N₂ (146.2) Ber. C 49.29 H 9.65 N 19.16 Gef. C 49.52 H 9.87 N 19.26

d,l-Pyrrolidon- α -carboyl-hydroxamsäure und *d,l*-Glutaminoyl- α -monohydroxamsäure (III): Diese beiden Verbindungen entstanden nebeneinander bei dem Versuch, Glutaminoyl-dihydroxamsäure über den Glutaminsäure-dimethylester darzustellen.

10 g Glutaminsäure wurden in 75 ccm Methanol in der Siedehitze mit Chlorwasserstoff gesättigt, 75 ccm Methanol zusätzlich zugegeben und weitere 3 Stdn. erhitzt. Danach wurde bei 35° i. Vak. eingengt, mit 30 ccm Methanol versetzt und der Ester mit ammoniakalischem Chloroform²⁶) in Freiheit gesetzt. Nach Absaugen des Ammoniumchlorids wurde überschüss. Lösungsmittel i. Vak. bei 30° abgedampft und der Ester mit einer alkohol. Hydroxylamin-Lösung unter Rühren und Kühlen versetzt. Die Hydroxylamin-Lösung wurde aus 9.5 g Hydroxylaminhydrochlorid wie oben bereitet. Die nach 2 Tagen abgesaugten 6.8 g einer Fällung erwiesen sich — wie das Chromatogramm zeigte — als ein Gemisch aus Glutaminoyl- α -monohydroxamsäure und Pyrrolidon- α -carboyl-hydroxamsäure. 6 g dieses Gemisches, gelöst in 45 ccm siedendem Wasser, lieferten beim Abkühlen eine Kristallisation feiner weißer Nadeln. Diese erste Fraktion erwies sich chromatographisch als reine Glutaminoyl- α -monohydroxamsäure. Die Mutterlauge schied beim Abkühlen eine grobkristalline Substanz im Verlauf eines Tages aus (2. Fraktion); diese stellte ein Gemisch beider Hydroxamsäuren dar (Chromatogramm). Aus der Mutterlauge kristallisierte nach dem Versetzen mit dem gleichen Vol. Methanol fast reine Pyrrolidon- α -carboyl-hydroxamsäure im Eisschrank aus. Die Glutaminoyl- α -monohydroxamsäure (III) schmilzt bei 186—187°; R_F-Wert: 0.11.

C₅H₁₀O₄N₂ (162.1) Ber. C 37.04 H 6.22 N 17.26 Gef. C 37.35 H 6.25 N 17.04

III fällt mit Kupfer(II)-acetat als grünes Kupfersalz; Farbreaktion mit Eisen(III)-chlorid positiv, mit Ninhydrin auf dem Papier gelbbraune Flecken.

Vergleich der erhaltenen Glutaminoyl- α -monohydroxamsäure mit der bekannten Glutaminoyl- γ -monohydroxamsäure: 1.) Der Schmelzpunkt für die γ -Säure ist in der Literatur mit 155° angegeben, die erhaltene analysenreine Glutaminoyl- α -monohydroxamsäure schmilzt scharf bei 186—187°.

2.) Die neue Verbindung konnte auch papierchromatographisch als verschieden von der Glutaminoyl- γ -monohydroxamsäure erkannt werden. Zu diesem Zweck wurde sowohl Glutamin als auch Glutaminsäure- γ -äthylester²⁷) mit wäßrig alkalischer Hydroxylamin-Lösung versetzt; die in beiden Fällen sich bildende Glutaminoyl- γ -monohydroxamsäure zeigte im Papierchromatogramm einen kleineren R_F-Wert (0.06) als die α -Säure (0.11).

3.) Mit Ninhydrin ergibt die γ -Säure auf dem Papier die für Aminosäuren charakteristische blaviolette Farbreaktion, während die Glutaminoyl- α -monohydroxamsäure den für α -Amino-hydroxamsäuren typischen gelbbraunen Farbfleck zeigt.

Pyrrolidon- α -carboyl-hydroxamsäure: Der aus 12 g Glutaminsäure wie oben erhaltene freie Ester wurde durch Erhitzen i. Vak. (8 Torr, 160° Bad-Temp., 30 Min.) in den Pyrrolidon- α -carbonsäuremethylester übergeführt. Der sirupartige Rückstand in 15 ccm Methanol gelöst, abfiltriert und mit einer alkohol. Hydroxylamin-Lösung (aus 11.4 g Hydroxylaminhydrochlorid) unter Rühren und Kühlen versetzt, ergab eine klare Lösung, die eine starke Eisen(III)-chlorid-Reaktion zeigte. Nach 2 Tagen waren bei Raumtemperatur 6 g grobkristalline Pyrrolidon- α -carboyl-hydroxamsäure auskristallisiert. Zur Analyse wurde aus Wasser umkristallisiert. Schmp. (Zers.) 166—167°; R_F-Wert 0.28.

C₅H₉O₃N₂ (144.1) Ber. C 41.66 H 5.59 N 19.44 Gef. C 41.52 H 5.61 N 19.27

²⁵) Sämtliche R_F-Werte beziehen sich auf das Lösungsmittel: 75 ccm *sek.*-Butanol, 15 ccm Ameisensäure, 10 ccm Wasser. Papiersorte: Schleicher & Schüll, 2043 b. Absteigende Chromatographie. ²⁶) G. Hillmann, Z. Naturforsch. 1, 682 [1946].

²⁷) B. Hegedüs, Helv. chim. Acta 31, 745 [1948].

Fällt mit Kupfer(II)-acetat als grünes Kupfersalz; keine Farbreaktion mit Ninhydrin.

Farbreaktionen der Aminohydroxamsäuren

a) Eisen(III)-chlorid-Lösung: Die Aminohydroxamsäuren geben — wie allgemein die Hydroxamsäuren — mit FeCl_3 -Lösung eine intensiv weinrote Färbung. Die in Wasser schwer löslichen Aminohydroxamsäuren, wie z. B. Leucinhydroxamsäure, löst man in der nötigen Menge $0.5n\text{HCl}$.

Die rote Farbe ist jedoch nur im schwach sauren Gebiet beständig, sie kann durch Zugabe von Salzsäure vollkommen zum Verschwinden gebracht werden und tritt nach Abstumpfen der Säure wieder auf. Als FeCl_3 -Reagens wurde eine 3-proz. methanol. Lösung verwendet, die sich auch zum Entwickeln der Chromatogramme von Hydroxamsäuren bewährte.

b) Ninhydrin: Die α -Aminohydroxamsäuren geben beim Aufkochen mit einigen Körnchen Ninhydrin in wäbr. Lösung eine tiefe Rotfärbung; in geringerer Konzentration ist die Farbe gelbrot. Die anderen Hydroxamsäuren ohne freie Aminogruppe, z. B. Hippurhydroxamsäure und Pyrrolidon- α -carboyl-hydroxamsäure zeigen mit Ninhydrin keine Farbreaktion. Auf Papier aufgetragen, ergeben die freien Aminohydroxamsäuren mit Ninhydrin gelbbraune Flecken. Diese Farbreaktion ist nicht so empfindlich wie die FeCl_3 -Reaktion. Ein Fleck der Glutaminoyl- α -monohydroxamsäure wird mit Ninhydrin in der oberen Hälfte gelbbraun und in der unteren hellrot gefärbt, ein solcher der Glutaminoyl- γ -monohydroxamsäure wird wie eine normale Aminosäure blauviolett gefärbt.

Reduktionswirkung der Aminohydroxamsäuren

Alle Aminohydroxamsäuren, auch Hippurhydroxamsäure und Pyrrolidon- α -carboyl-hydroxamsäure, reduzieren wie freies Hydroxylamin eine ammoniakalische Silbernitrat-Lösung. Die Reduktion wird durch schwaches Erwärmen stark beschleunigt. Diese Reduktionswirkung unter Abscheidung elementaren Silbers kann auch zur Sichtbarmachung der Hydroxamsäuren auf dem Papier benutzt werden, doch ist die Empfindlichkeit nicht größer als die der FeCl_3 -Reaktion, die Ausführung ist auch umständlicher. Die Anwendung von Triphenyltetrazoliumchlorid als Reduktionsindicator zur Sichtbarmachung von Hydroxamsäuren eignet sich ebenfalls weniger gut als die FeCl_3 -Reaktion.

Fällung mit Kupfer(II)-Salzen

Alanin-, α -Amino-buttersäure-, Valin-, Leucin- und Isoleucinhydroxamsäure geben in wäbr. oder in schwach salzsaurer, mit Natriumacetat gepufferter Lösung, mit Kupfer(II)-acetat oder Kupfer(II)-sulfat tiefdunkelgrüne Lösungen, aus denen jedoch kein Niederschlag ausflockt. Wie bei der Glycinhydroxamsäure¹⁵⁾ wird auf Zugabe einer stärker verdünnten Kupfer(II)-Salz-Lösung die wäbr. Lösung der anderen Hydroxamsäuren zunächst unter Bildung des sauren Salzes violett gefärbt; ein Überschuß führt zum Farbumschlag nach Dunkelgrün, wobei sich das neutrale grüne Salz bildet. Nach Ley und Männchen¹⁶⁾ soll Glycinhydroxamsäure aus wäbr. Lösung mit Kupfer(II)-acetat als Kupfersalz gefällt werden können. Beim Versetzen von Glycinhydroxamsäure mit einer Kupfer(II)-acetat-Lösung entstanden aber immer nur die dunkelgrünen Lösungen; Niederschlagsbildung trat nicht ein. Anscheinend müssen hier ganz bestimmte Konzentrationsbedingungen erfüllt sein. Beim Versetzen einer wäbr. Lösung von Glycinhydroxamsäure mit Kupfer(II)-sulfat-Lösung entstand zunächst eine dunkelgrüne Lösung, die sich unter Abscheidung des Kupfersalzes bald trübte. Hier erfolgte also die Abscheidung des Kupfersalzes, während die anderen Aminohydroxamsäuren nicht fällbar waren. Die sehr gut fällbaren Kupfersalze der acylierten Aminohydroxamsäuren gehen auf Zugabe verd. Salzsäure in Lösung, werden aber beim Abpuffern mit Natriumacetat wieder ausgefällt. Glutaminoyl- α -monohydroxamsäure läßt sich normal ausfällen.

Thermische Zersetzung

20 mg Alaninhydroxamsäure wurden in ein Glühröhrchen gefüllt, dessen anschließend ausgezogene Spitze in ein mit verd. Schwefelsäure gefülltes und mit doppelt durchbohrtem Stopfen verschlossenes kleines Reagensröhrchen tauchte. Von hier aus führte eine Ableitung in eine mit Barytlauge beschickte Vorlage. Die Alaninhydroxamsäure wurde nun im Paraffinbad langsam auf ihren Zersetzungspunkt (160°) erhitzt. Es trat hierbei eine starke Gas-Entwicklung ein. In der mit Barytlauge beschickten Vorlage fiel Bariumcarbonat aus. Zum Nachweis des Ammoniaks wurde bei einem neu gefüllten Glühröhrchen die mit verd. Schwefelsäure gefüllte Vorlage gegen eine Wasser enthaltende ausgewechselt; die Zersetzungsgase wurden in eine Lösung von Nessler-Reagens eingeleitet. Sofort nach Beginn der Zersetzung gab sich Ammoniak durch die typische Nessler-Reaktion zu erkennen (Hydroxylamin bildet mit Nessler-Reagens keinen rot-braunen Niederschlag, sondern es wird durch Reduktion grauschwarzes elementares Quecksilber abgeschieden).

Chromatographiert man die bei der Zersetzung entstehende Schmelze, so stellt man fest, daß die der Aminohydroxamsäure zugrunde liegende Aminosäure z. Tl. zurückgebildet wurde. Auf dem mit Eisen(III)-chlorid entwickelten Chromatogramm ist an Stelle eines starken Alaninhydroxamsäureflecks ein an dieser Stelle schwacher verwischter Fleck, der meist nach oben starke Schwanzbildung zeigt.

Benzoyl-*d,l*-alaninhydroxamsäure-benzoat (VI; R=CH₃): Diese Verbindung wurde dargestellt durch Benzoylierung der *d,l*-Alaninhydroxamsäure in einer wäfr.-alkal. Lösung, die je Mol. Hydroxamsäure 2 Moll. Natriumhydroxyd enthält. Unter diesen Bedingungen scheidet sich das Benzoylierungsprodukt gegen Ende der Benzoylierung aus der wäfr. Lösung aus. Die Benzoylierung ist beendet, wenn die Ansatzlösung keine FeCl₃-Reaktion mehr gibt. Die ausgefallene Substanz wird mit Benzol ausgewaschen und aus Aceton umkristallisiert; Schmp. (Zers.) 138°.

C₁₇H₁₆O₄N₂ (312.3) Ber. C 65.37 H 5.16 N 8.97 Gef. C 65.66 H 5.52 N 8.84

Benzoyl-*d,l*-leucinhydroxamsäure-benzoat (VI; R=CH₂·CH(CH₃)₂) wurde ähnlich wie oben dargestellt, nur wurden 1 Äquiv. Natriumhydroxyd zur Salzbildung der Leucinhydroxamsäure und für die entstehende Salzsäure die nötige Menge Natriumcarbonat zur Neutralisation angewandt. Gegen Ende der Benzoylierung schied sich die dibenzoylierte Hydroxamsäure ab, obwohl noch 1 Äquiv. Alkali zur Salzbildung anwendend war. 2.9 g *d,l*-Leucinhydroxamsäure lieferten 5.4 g (78% d.Th.) rohe Dibenzoyl-Verbindung. Die Analysensubstanz wurde aus Methanol umkristallisiert; Schmp. (Zers.) 157°.

C₂₀H₂₂O₄N₂ (354.4) Ber. C 67.77 H 6.25 N 7.90 Gef. C 67.32 H 6.19 N 8.03

Hippurhydroxamsäure-benzoat (VI; R=H): In einer Lösung aus 70 ccm Wasser, 1.5 g Natriumcarbonat und 1.03 g Natriumhydroxyd wurden 5 g Hippurhydroxamsäure gelöst und unter Schütteln und Kühlen mit 2.95 ccm Benzoylchlorid versetzt. Auf Zugabe der zur Neutralisation erforderlichen Menge Eisessig fiel sofort ein voluminöser Niederschlag aus, der nach dem Auswaschen mit Wasser aus 100 ccm Methanol umkristallisiert wurde. Ausb. 4.5 g = 58.5% d.Th. (umkrist. Reinprodukt); Schmp. (Zers.) 157°–158°.

C₁₆H₁₄O₄N₂ (298.3) Ber. C 64.42 H 4.73 N 9.39 Gef. C 64.21 H 4.95 N 9.33

Kaliumsalz des Hippurhydroxamsäure-benzoats (VII; R=H): In eine Kaliummethylat-Lösung aus 0.200 g Kalium und 15 ccm absol. Methanol wurden 1.526 g reines Hippurhydroxamsäure-benzoat eingetragen. Sofort nachdem alles gelöst war, begann das Kaliumsalz des Hippurhydroxamsäure-benzoats auszukristallisieren; Zugabe von 40 ccm Äther vervollständigte die Fällung. Ausb. fast quantitativ; das Kaliumsalz zersetzt sich oberhalb von 200°.

C₁₆H₁₃O₄N₂K (336.4) Ber. N 8.32 Gef. N 8.18

(*N,N'*-Bis-[benzoylamino-methyl]-harnstoff (VIII): 2.675 g VII wurden mit 1 Mol.-Äquiv. 2.40 g NaOH in Lösung gebracht. Nach dem Auflösen der Substanz zeigte die Lösung einen p_H-Wert von 7.5. Aus der klaren Lösung schieden sich beim 1stdg.

Erhitzen im Wasserbad 1.4 g eines flockigen Niederschlags aus, der nach dem Umkristallisieren aus Dimethylformamid in rein weißer, fein kristalliner Form vorlag; Schmp. 247° (nach Th. Curtius²⁸⁾ 246°).

$C_{17}H_{18}O_3N_4$ (326.3) Ber. C 62.56 H 5.55 N 17.16 Gef. C 62.82 H 6.01 N 17.03

Ausb. 93% d.Theorie. Liefert bei vollkommener Hydrolyse Formaldehyd, Benzoesäure, Kohlensäure und Ammoniak.

Benzoyl-glycyl-*d,l*-leucinhydroxamsäure (IX): a) Über den Benzoyl-glycyl-*d,l*-leucinmethylester: 2.7 g des Benzoyl-dipeptidesters wurden in eine methanol. Hydroxylamin-Lösung eingetragen, die $\frac{1}{10}$ Äquiv. Hydroxylamin im Überschuß enthielt. Zu dieser Lösung wurde noch 1 Äquiv. Natriummethylat unter Kühlung hinzugefügt. Die Ansatzlösung zeigte sofort eine starke Eisen(III)-chlorid-Reaktion. Nach 12 Stdn. wurde der Ansatz eingengt, mit 60 ccm Wasser und zum Ansäuern mit 6 ccm Eisessig versetzt, worauf sich nur eine geringe ölige Trübung zeigte. Beim kurzen Erwärmen und Schütteln dieser Lösung begann aber rasch eine Kristallisation. Es kristallisierten 1.4 g (51% d.Th.) Rohhydroxamsäure aus; diese erwies sich (nach Schmelzpunkt und R_F -Wert) als identisch mit der, die in einfacherer Art nach der Anhydrid-Methode direkt aus dem Benzoyl-dipeptid erhalten wurde.

b) Anhydridmethode: 5 g Benzoyl-dipeptid wurden mit 17 ccm Tetrahydrofuran und 2.38 ccm Triäthylamin versetzt, worauf das Benzoyl-dipeptid in Lösung ging. Zur Anhydrid-Bildung wurde auf -20° gekühlt, dann wurden 1.64 ccm Chlorkohlensäure-äthylester innerhalb 5 Min. unter Rühren zugetropft. Aus der klaren Lösung schied sich dabei ein weißer Niederschlag aus (Triäthylamin-hydrochlorid). Nach weiteren 5 Min. wurde zu dem Ansatz eine auf -5° abgekühlte methanol. Hydroxylamin-Lösung zugegeben (2 Äquiv. Hydroxylamin). Nach 2 stdg. Stehenlassen bei Raumtemp. wurden zur Neutralisation 1 ccm Eisessig und 5 ccm Wasser zugesetzt; dann wurde der Ansatz i.Vak. auf die Hälfte eingengt. Die gebildete Hydroxamsäure IX ließ sich als Kupfersalz fällen; dazu waren 4.5 g Kupfer(II)-acetat + 1 H_2O erforderlich. Nach dem gründlichen Auswaschen des grünen Kupfersalzes mit Wasser, Aufschlänmen in heißem Methanol, Zersetzen mit Schwefelwasserstoff, Abfiltrieren vom Kupfersulfid und Abdampfen des Methanols i.Vak. wurden 4.1 g (78% d.Th.) von IX erhalten. Aus heißem Wasser Schmp. 160°; (Zers.) R_F -Wert: 0.81.

$C_{15}H_{21}O_4N_3$ (307.3) Ber. C 58.61 H 6.88 N 13.67 Gef. C 58.52 H 6.85 N 13.82

Benzoyl-glycyl-*d,l*-leucinhydroxamsäure-benzoat (X): In einer Lösung aus 0.40 g Natriumhydroxyd und 0.53 g Natriumcarbonat in 40 ccm Wasser, wurden 3.07 g Hydroxamsäure IX zur Auflösung gebracht und unter Kühlung und kräftigem Schütteln mit 1.12 ccm Benzoylchlorid versetzt. Gegen Ende der Benzoylierung schied sich ein geringer Teil der benzoylierten Hydroxamsäure als öliges Produkt ab, welches bald erstarrte. Nach dem Ansäuern des Ansatzes schied sich das rohe Benzoat X kristallin ab. Die Ausbeuten an Rohprodukt betragen nach dieser Methode etwa 55% d.Theorie. Aus Methanol Schmp. 150° (Zers.).

$C_{22}H_{25}O_5N_3$ (411.4) Ber. C 64.21 H 6.13 N 10.21 Gef. C 64.05 H 5.97 N 10.03

N,N'-Bis-[benzoylglycylamino-isobutyl-methyl]-harnstoff (XI): 0.218 g X wurden mit 5.45 ccm n_{10} NaOH ($F=0.975$) versetzt. Nachdem sich die Hydroxamsäure erst klar gelöst hatte, begann sich die Lösung schon nach einigen Minuten zu trüben. Bei 25° fielen innerhalb von 2 Tagen 0.131 g (90% d.Th.) XI aus. Aus Methanol Schmp. 204°.

$C_{29}H_{40}O_5N_5$ (552.7) Ber. C 63.00 H 7.29 N 15.20 Gef. C 62.50 H 7.49 N 15.29

Hydrolyse von XI zur Charakterisierung der carboxyl-endständigen Aminosäure als Aldehyd: Beim kurzen Aufkochen von etwa 5 mg des Harnstoff-Derivates mit 7-proz. Salzsäure wird nach dem Filtrieren und Zufügen einer salzsauren Lösung von 2.4-Dinitro-phenylhydrazin sofort das 2.4-Dinitro-phenylhydrazon des Isovaleraldehyds ausgeschieden; dieses zeigte in einem Gemisch von Dekalin + (0.5% Nitrobenzol²⁹⁾ den gleichen R_F -Wert wie authentisches Vergleichsmaterial.

²⁸⁾ J. prakt. Chem. [2] 52, 262 [1895].

²⁹⁾ Privatmitteil. von Hrn. Prof. Turba, Mainz.

Benzoyl-glycyl-*d,l*-isoleucyl-*d,l*-alaninhydroxamsäure (XII). a) Ester-methode: 3.00 g Benzoyl-tripeptid wurden in 50 ccm Methanol gelöst und eine äther. Diazomethan-Lösung bis zur bleibenden Gelbfärbung langsam unter Kühlung zugegeben. Das veresterte Benzoyl-tripeptid hinterblieb nach dem sofortigen Abdampfen des Lösungsmittels i. Vak. als weiße, kristalline Substanz; Ausb. 3.1 g = 99.5% d. Theorie.

3.1 g Benzoyl-tripeptid-methylester wurden mit einer alkohol. Hydroxylamin-Lösung versetzt, welche 3 Mol.-Äquivv. freies Hydroxylamin und 1.2 Mol.-Äquivv. Natriummethylat enthielt. Der Ansatz wurde zunächst $1\frac{1}{2}$ Stdn. im Trockenschrank auf 40° gehalten und blieb dann im ausgeschalteten Trockenschrank noch 12 Stdn. stehen. Aus der methanol. Lösung hatte sich das Natriumsalz von XII in Form weißer kugeligter Kristallaggregate ausgeschieden. Die ausgefallene Substanz wurde durch Zugabe von 1.7 ccm Eisessig und 5 ccm Wasser bei 50° gelöst. Mit einer wäbr. Lösung von 2.2 g Kupfer(II)-acetat $\cdot 1\text{H}_2\text{O}$ ließ sich die gebildete Hydroxamsäure als Kupfersalz vollständig fällen; im Filtrat war keine Hydroxamsäure mehr nachweisbar. Das Kupfersalz wurde, wie üblich, mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Ausb. an XII: 2.8 g = 90% d. Theorie. Aus Methanol Schmp. 190° (Zers.) nach Sintern; R_F -Wert 0.79.

$\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{O}_5\text{N}_4$ (378.4) Ber. C 57.12 H 6.92 N 14.80 Gef. C 57.49 H 6.92 N 14.72

b) Anhydridmethode: 0.40 g Benzoyl-tripeptid wurden mit 15 ccm Tetrahydrofuran und 0.32 ccm Triäthylamin versetzt. Das benzoyletrierte Tripeptid ging dabei nicht in Lösung. Unter guter Kühlung mit Eis-Kochsalz erfolgte bei langsamer Zugabe von 0.22 ccm Chlorkohlensäureäthylester die Anhydrid-Bildung in heterogener Reaktion.

Zu dem Anhydrid wurde eine gut vorgekühlte wäbr. Hydroxylamin-Lösung, welche durch Auflösung von 0.8 g Hydroxylamin-hydrochlorid in 3 ccm Wasser und Neutralisation mit 1.61 ccm Triäthylamin bereitet worden war, unter kräftigem Umschütteln auf einmal hinzugefügt. Nach etwa 10 Min. wurde der Ansatz mit Eisessig angesäuert, das Tetrahydrofuran i. Vak. abgedampft, die eingeengte Lösung mit Methanol und etwas Wasser versetzt und mit einer wäbr. Lösung von 1 g Kupfer(II)-acetat $\cdot 1\text{H}_2\text{O}$ die Hydroxamsäure als grünes Kupfersalz gefällt. Das Kupfersalz wurde wie üblich mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Austeute an XII: 0.565 g (64.5 % d. Th.). Die Hydroxamsäure erwies sich als identisch mit der nach der Estermethode bereiteten.

Benzoyl-glycyl-*d,l*-isoleucyl-*d,l*-alaninhydroxamsäure-benzoat (XIII): 1.2 g XII wurden mit 10 ccm Wasser versetzt und durch Zugabe von 0.13 g Natronlauge in 5 ccm Wasser in Lösung gebracht. Die zur Benzoylierung erforderlichen 0.40 ccm (1.1 Mol) Benzoylchlorid und 0.25 g Natriumcarbonat in 5 ccm Wasser wurden abwechselnd anteilweise zugesetzt. Die sich ausscheidende Gallerte löste sich auf Zugabe des folgenden Anteils Soda-Lösung fast völlig wieder auf. Am Ende der Umsetzung war jedoch die Substanz gallertartig ausgefallen; Reaktion schwach basisch. Mit 2*n*NaOH wurde die Gallerte wieder in Lösung gebracht. XIII ließ sich aus der alkal. Lösung nach dem Filtrieren mit 2*n*HCl ausfällen; die Substanz fällt entweder sofort in fester Form aus oder sie ist für kurze Zeit ölig. Ausb. 1.36 g (89% d. Th.) mit Äther ausgewaschenes Produkt. Man kristallisiert aus Wasser + Methanol (1:2) um. Die Analysensubstanz wurde im Hochvak. bei Raumtemperatur getrocknet; Schmp. 153° (Zers.).

$\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{O}_6\text{N}_4 + \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ (491.5) Ber. C 61.08 H 6.35 N 11.40 Gef. C 61.06 H 6.53 N 11.50

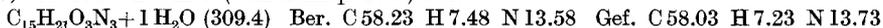
N,N'-Bis- $[\alpha$ -benzoyl-glycyl-*d,l*-isoleucyl-amino-äthyl]-harnstoff (XIV): 1.22 g XIII wurden in 25.4 ccm $\frac{1}{10}$ *n*NaOH gelöst und die Lösung 18 Stdn. auf 35° gehalten. Es begann sehr rasch die Ausscheidung des Harnstoff-Derivats (die Umlagerung ist beendet, wenn eine abfiltrierte Probe beim Erhitzen keine Trübung mehr zeigt). Im Filtrat konnte Acetaldehyd nachgewiesen werden, d.h. daß unter den angewandten Umlagerungsbedingungen ein geringer Teil von XIV bereits hydrolysiert worden war. Die von der ausgefallenen Substanz abfiltrierte Lösung lieferte beim Ansäuern nur die abgespaltene Benzoesäure (Schmp. 121°). Ausb. an XIV 0.76 g (90% d. Th.) Rohprodukt; Schmp. gegen 190° (Zers.). Aus allen angewandten Lösungsmitteln fiel die Verbindung als äußerst voluminöse Gallerte aus; es konnte daher keine saubere Umkristallisation erzielt werden.

Hydrolysen von XIV. 1.) Hydrolyse zur Charakterisierung der carboxyl-endständigen Aminosäure als Aldehyd: Beim kurzen Aufkochen einiger mg von XIV mit 1*n*HCl tritt deutlich der Geruch nach Acetaldehyd auf. Nachdem vom Ungelösten abfiltriert war, fiel auf Zugabe von salzsaurem 2.4-Dinitro-phenylhydrazin das 2.4-Dinitro-phenylhydrazon des Acetaldehyds aus; die Identifizierung erfolgte wie bei XI.

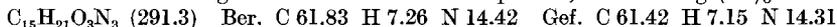
2.) Hydrolyse im Einschlußrohr: Eine Probe von XIV konnte durch 16stdg. Erhitzen mit Wasser auf 160° unter Abspaltung von Acetaldehyd in einen Stoff zerlegt werden, der nun im Gegensatz zu XIV beim Abkühlen der Lösung in kugelförmigen Kristallaggregaten kristallisierte. Nach der totalen Hydrolyse wurden nur noch Glycin und Isoleucin im Papierchromatogramm angezeigt. Der Schmp. dieser Verbindung liegt bei 178°. Die für Benzoyl-glycyl-*d,l*-isoleucin-amid berechnete Zusammensetzung ergibt folgenden Stickstoffwert:



3.) Hydrolyse mit verd. Salzsäure: Beim Erhitzen mit 1*n*, $\frac{1}{10}$ *n* und $\frac{1}{50}$ *n*HCl wurde XIV in 5–10 Min. im siedenden Wasserbad in die oben beschriebene Verbindung vom Schmp. 178° verwandelt. Z.B. wurden 100 mg XIV mit 4 ccm $\frac{1}{10}$ *n*HCl und 3 ccm reinem *n*-Propanol im siedenden Wasserbad erhitzt, worauf sich die Substanz löste. Gleichzeitig wurde durch den Hydrolyseansatz Luft gesaugt, und zwar so, daß nach 5–10 Min. der Propylalkohol zum größten Teil verdampft war. Die Lösung begann sich dann zu trüben und beim Abkühlen kristallisierten 64 mg (74% d. Th.) Benzoyl-glycyl-*d,l*-isoleucin-amid (vom Schmp. 178°) aus.



Benzoyl-glycyl-*d,l*-leucinamid (XVI, analog XV): 5 g Benzoyl-glycyl-*d,l*-leucin (aus Hippursäure und *d,l*-Leucin nach der Anhydridmethode mit 60% Ausb.) wurden in 38 ccm Tetrahydrofuran und 2.38 ccm Triäthylamin gelöst. Bei guter Eis-Kochsalz-Kühlung erfolgte die Anhydrid-Bildung durch Zugabe von 1.64 ccm Chlorkohlensäureäthylester. Das Anhydrid wurde mit 5 ccm konz. wäßr. Ammoniak-Lösung, welche auf etwa -10° abgekühlt worden war, auf einmal versetzt und sofort im Kältebad kräftig geschüttelt. Nach etwa 15 Min. wurde zu dem Ansatz Wasser hinzugefügt. Es fiel sofort eine große Menge eines weißen, feinkristallinen Stoffs aus. Der Niederschlag konnte durch Abdampfen des Tetrahydrofurans i. Vak. vermehrt werden. Das ausgefallene Produkt war das gewünschte Amid. Die Umkristallisation erfolgte aus Wasser, dem etwas Methanol zugesetzt worden war. Schmp. 204°; Ausb. 3.6 g (71% d. Th.).



Verseifung des Amids: 275 mg wurden mit 5 ccm 1*n*NaOH im Wasserbad auf 100° erwärmt. Unter Abspaltung von Ammoniak ging das Amid innerhalb von 30 Min. völlig in Lösung. Nach dem Einstellen in Eis + Wasser wurde filtriert und mit konz. Salzsäure angesäuert, wobei sich Benzoyl-glycyl-*d,l*-leucin erst ölig abschied, aber nach 10 Min. kristallisierte. Die erhaltene Substanz zeigte beim Misch-Schmelzpunkt mit authentischem Benzoyl-glycyl-*d,l*-leucin (Schmp. 152°) keine Erniedrigung; Ausb. 189 mg (68% d. Th.).